

0- 772622

На правах рукописи

**КНЯЗЬКИН
Игорь Владимирович**

**ЭКСТРАПИНЕАЛЬНЫЙ МЕЛАТОНИН
В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ**

14.00.53 – геронтология и гериатрия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Санкт-Петербург – 2008

**Работа выполнена в отделе клеточной биологии и патологии
Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии
Северо-Западного отделения РАМН**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор
Кветной Игорь Моисеевич

Официальные оппоненты:

академик РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Корнева Елена Андреевна

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Райхлин Натан Танфелевич

доктор медицинских наук, профессор
Смирнов Олег Алексеевич

Ведущая организация:

ФГУ «Российский научно-исследовательский институт геронтологии
Росздрава»

Защита состоится « _____ » _____ 2008 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 601.001.01 в Санкт-Петербургском институте
биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу: 197110, Санкт-
Петербург, пр. Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского
института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН (197110, Санкт-
Петербург, пр. Динамо, д. 3).

Автореферат разослан « _____ » _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Козина Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Многочисленными исследованиями показано, что при старении происходит выраженная инволюция пинеальной железы (эпифиза) [Reiter R.J., 1999, 2003]. При этом установлено, что морфологические изменения, развивающиеся в эпифизе в процессе возрастной инволюции, неразрывно связаны с резким падением уровня продукции мелатонина (МТ) – основного гормона пинеальной железы, координирующего биологические ритмы организма на всех уровнях его организации [Анисимов В.Н., Рейтер Р., 1990; Charman W.N., 2003].

МТ является гормоном широкого спектра действия – он участвует в регуляции иммунной и эндокринной систем, обладает пролиферотропным действием, модулируя дифференцировку и апоптоз клеток, участвует в регуляции зрительной функции, снижает уровень холестерина, повышает сопротивляемость организма стрессам и высоким физическим нагрузкам, способствует нормализации кровяного давления и подавляет действие свободных радикалов [Арутюнян А.В. и др., 2003; Reiter R.J. et al., 1998, 2002]. Эти свойства позволяют рассматривать МТ как перспективный для детального изучения эндогенный гормональный фактор, обладающий геропротекторными свойствами.

Важную роль МТ в процессах старения отражает демонстрация существенного снижения уровня ночной экскреции МТ с мочой, как у старых животных, так и у пожилых людей [Arendt J., 1995; Bartsch et al., 2001].

При пинеалэктомии (общепринятая модель преждевременного старения) наблюдается иммуносупрессия, сходная с таковой при естественном старении, которая снимается введением экзогенного МТ [Maestroni G., Konti A., 2002]. Определенное значение для увеличения вероятности аутоиммунных расстройств при старении имеет снижение продукции МТ – гормона, обладающего антиканцерогенными и антиоксидантными свойствами, а также способного ограничивать возрастную гиперкортицизм, защищающего клетки иммунной и нервной системы от окислительного стресса.

Более половины всех мужчин старше 50 лет страдают опухолевыми заболеваниями простаты, что нарушает половую функцию и мочеиспускание. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что МТ предупреждает развитие доброкачественной гиперплазии предстательной железы и задерживает атрофию половых органов, что обычно происходит при старении мужского организма. Учитывая широкий спектр биологической активности МТ и особенно его свойств ключевого регулятора биологических ритмов и мощного природного антиоксиданта, МТ можно рассматривать как важнейший фактор регуляции жизненно важных функций организма. Поэтому уровень продукции МТ в организме имеет принципиальное значение для обеспечения его жизнедеятельности в различные возрастные периоды.

Твердо установлено, что пинеальная железа не является исключительным органом, способным продуцировать МТ [Raikhlin N.T. et al., 1975; Raikhlin N.T., Kvetnoy I.M., 1978; Bubenik G. et al., 1985; Kvetnoy I.M., 1999; 2002]. Многочисленными исследованиями показано, что экстрапинеальный МТ широко распространен в организме человека и животных: клетки, продуцирующие МТ, обнаружены в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, в поджелудочной железе, надпочечниках, щитовидной железе, тимусе, мозжечке, мочеполовой системе, плаценте и других органах. Более того, показана активная продукция МТ в неэндокринных клетках – тучных клетках, естественных киллерах, эозинофильных лейкоцитах, тромбоцитах, эндотелиоцитах [Кветной И.М., Райхлин Н.Т., 1996, 1998; Кветной И.М. и др., 2002; Kvetnoy I.M., 1999]. Такое широкое распространение МТ в организме отражает его ключевую роль как межклеточного нейроэндокринного регулятора и координатора многих сложных и взаимосвязанных биологических процессов.

При возрастной инволюции пинеальной железы происходит снижение концентрации МТ в организме, что, в свою очередь, влечет изменение каскада многих метаболических процессов и негативно отражается на функции многих органов и систем. Однако, при этом сведения о возрастных структурно-функциональных изменениях экстрапинеальных источников МТ и особенностях секреции экстрапинеального МТ при старении отсутствуют, что ограничивает понимание роли и значения МТ и свидетельствует о необходимости исследований в этом направлении.

Фундаментальные исследования, предпринятые на молекулярном и клеточном уровнях, будут способствовать познанию механизмов старения и разработке эффективных методов диагностики, лечения и профилактики патологии, ассоциированной с возрастом.

Цель и задачи работы

Целью диссертационного исследования является установление роли и значения экстрапинеального мелатонина в процессах старения организма.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

- 1) исследовать функционально-морфологические изменения пинеальной железы при старении у человека;
- 2) выявить структурно-функциональную организацию экстрапинеальных источников мелатонина при старении у человека и экспериментальных животных;
- 3) описать степень и характер изменений мелатонин-содержащих энтерохромаффинных клеток желудка в биоптатах слизистой оболочки желудка у людей пожилого и старческого возраста с различной патологией (заболевания желудка и кишечника);
- 4) выявить связь характера изменений содержания мелатонина в клетках предстательной железы с развитием опухолей, ассоциированных с

возрастом (доброкачественная гиперплазия предстательной железы и рак простаты);

5) изучить возможность локальной продукции мелатонина в неэндокринных опухолях у пожилых и старых людей и оценить значение этого феномена в процессах опухолевой прогрессии;

6) проанализировать нейроэндокринные аспекты участия мелатонина в процессах старения и патогенезе заболеваний, ассоциированных с возрастом.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Проведенные исследования позволили установить, что при естественном старении у человека, так же как в различных моделях преждевременного и ускоренного старения (пинеалэктомия и облучение сублетальными дозами), у животных наблюдаются изменения структурно-функциональной организации пинеальной железы и экстрапинеальных МТ-содержащих клеток.

Впервые установлено, что в то время как уровень секреции пинеального МТ прогрессивно снижается с возрастом, экстрапинеальная экспрессия МТ в различных органах стабильно сохраняется до 60 лет и только у более старых людей достоверно снижается. При этом наиболее устойчива в структурно-функциональном отношении популяция МТ-содержащих клеток бронхиального эпителия и надпочечников. Показано достоверное снижение накопления МТ в иммунокомпетентных клетках, сопровождающееся нарушением их структурно-функциональной организации.

Проведенные исследования показали неодинаковую реакцию гастроинтестинальных МТ-содержащих клеток в различных моделях старения, что свидетельствует о возможности активного участия экстрапинеального МТ в возрастной инволюции органов и тканей и компенсации нарушенных физиологических процессов при разных способах инициации старения.

Впервые получены данные о динамике распределения меченого МТ и антител к нему в организме молодых и старых животных. Установлены ключевые органы-мишени МТ и время поглощения МТ их паренхимой.

Детально описано морфофункциональное изменение экстрапинеальных источников МТ при заболеваниях, ассоциированных с возрастом, и опухолях различной локализации у пожилых и старых людей.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что оно существенно расширяет современные представления о нейроиммуноэндокринологии и геронтологии для понимания изменения структуры и функции пинеальной железы и значимости экстрапинеальных МТ-содержащих клеток при старении.

Практическая ценность работы

Впервые установлены диагностически и прогностически значимые изменения функциональной активности экстрапинеальных МТ-содержащих клеток при различной патологии у пациентов пожилого и старческого возраста (заболевания желудочно-кишечного тракта, нейродегенеративные процессы,

опухолевый рост), позволяющие проводить оценку прогноза и выбор терапии, оптимизирующей нарушенные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, усугубляющие течение патологического процесса при старении.

Установлено, что локальное нарушение синтеза МТ нейроэндокринными клетками простаты является важным патогенетическим фактором развития возрастных гиперпластических процессов в предстательной железе.

В злокачественных эпителиальных (раковых) опухолях гортани, легких, желудка и толстой кишки обнаружена эктопическая секреция МТ в клетках, локализованных в ткани опухоли. Установлено, что по мере прогрессии опухолей содержание МТ в опухолях снижается, достигая минимальных значений при распространенных метастазах, что может явиться информативным прогностическим маркером опухолевого процесса.

Выявление ключевых органов-мишеней МТ и определение времени его поглощения органами и выведения из организма может явиться предпосылкой для разработки геропротекторных лекарственных препаратов на основе МТ.

Положения, выносимые на защиту

1. Экстрапинеальная популяция мелатонин-содержащих клеток сохраняет относительную структурно-функциональную стабильность в пожилом возрасте, что обуславливает возможность участия мелатонина в осуществлении регуляции физиологических процессов в стареющем организме, несмотря на выраженную инволюцию пинеальной железы.

2. Мелатонин-содержащие клетки являются важным звеном в нейроиммуноэндокринных процессах старения организма.

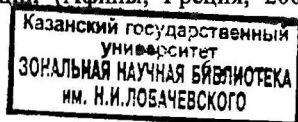
3. Локальное нарушение продукции мелатонина нейроэндокринными клетками простаты является важным патогенетическим фактором развития возрастных гиперпластических процессов в предстательной железе.

4. Количество мелатонин-содержащих клеток в неэндокринных злокачественных опухолях коррелирует со степенью прогрессии опухолей и помогает прогнозировать развитие заболевания у пожилых и старых людей.

5. Структурно-функциональные изменения экстрапинеальных мелатонин-содержащих клеток являются важным компонентом в патогенезе соматических заболеваний, ассоциированных с возрастом.

Апробация диссертации

Основные результаты и положения диссертационной работы доложены и обсуждены на VI Научной конференции с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге – 2002» (Санкт-Петербург, 2002), XII Всероссийской конференции «Нейроиммунология» (Санкт-Петербург, 2003), XIII Европейском конгрессе по микроскопии (Антверпен, Бельгия, 2004), XII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2005), II Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Санкт-Петербург, 2005), VI Международной конференции по нейроиммуномодуляции (Афины, Греция, 2005), II Всероссийской научно-



практической конференции «Общество, государство и медицина для пожилых больных и инвалидов» (Москва, 2005), IV Национальном конгрессе геронтологов и гериатров Украины (Киев, 2005), II Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2005), XIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2006), Всероссийской конференции «Актуальные вопросы внутренних болезней» (Санкт-Петербург, 2006), II Международном экологическом симпозиуме (Полоцк, 2006), VII Международном симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 2006); Конференции «Перспективы фундаментальной геронтологии» (Санкт-Петербург, 2006), II Научно-практической конференции с международным участием по геронтологии и гериатрии, посвященной памяти Э.С. Пушковой (Санкт-Петербург, 2006).

Реализация результатов исследования

Результаты исследований изложены в двух главах «Руководства по нейроиммуноэндокринологии» (М., Медицина, 2006), которое рекомендовано Департаментом образования Минздравсоцразвития РФ в качестве учебника для студентов медицинских вузов. Они также используются в научной, педагогической и практической деятельности Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, Санкт-Петербургского государственного университета, Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Медицинского радиологического научного центра РАМН, Института иммунологии ФМБА РФ, Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 37 научных работ, в том числе 11 статей, из них 8 статей в журналах по перечню ВАК Минобрнауки РФ, монографий – 5, глав в руководстве – 2, тезисов докладов – 19.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 244 страницах, содержит 13 таблиц и иллюстрирован 57 рисунками. Список литературы содержит 367 источников, из которых на русском языке – 95, на иностранных языках – 272.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методология изучения пинеальной железы и экстрапинеальных источников мелатонина при старении

Пинеальная железа и экстрапинеальные источники МТ в висцеральных органах. Для изучения функциональной морфологии пинеальной железы и экстрапинеальных источников МТ при старении человека было проведено исследование образцов пинеальной железы, различных отделов желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, надпочечников, предстательной железы, полученных как при аутопсиях, так и в процессе проведения диагностических биопсийных исследований. Были изучены образцы биоптатов различных органов, полученные от 175 человек мужского пола в возрасте от 16 до 84 лет.

Плацента. Объектом для изучения накопления МТ в плаценте человека и оценки его роли в старении плаценты был избран ворсинчатый хорион 57 доношенных и 14 переносимых плацент, полученных при родах в родильном отделении НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН у женщин разного возраста. Для исследования были отобраны плаценты первородящих женщин со срочными родами без осложнений. Материал был распределен по возрастам женщин на 5 групп (<18, 18-28, 29-35, 36-40 и >40 лет). В качестве группы сравнения была выбрана группа 2 – плаценты женщин нормального репродуктивного возраста (возраст от 18 до 28 лет).

Естественные киллеры (НК-клетки). НК-клетки были получены путем центрифугирования в градиенте фиколла. Для этого гепаринизированную кровь доноров (возраст 27-36 лет) или крыс линии Вистар (возраст 4 мес.) отстаивали в течение 50 мин для получения плазмы. Иммуногистохимическому и электронно-микроскопическому изучению подвергались как лимфоциты отдельных доноров, так и инкубированные совместно лимфоциты от разных доноров в течение 4 ч при температуре +37 °С. Цель совместного инкубирования заключалась в провокации взаимодействия НК-клеток, принадлежащих разным донорам.

Эндотелий. Объектом исследования были избраны капилляры органов с хорошо развитой системой кровоснабжения (печени, селезенки, костного мозга) крыс линии Вистар.

Методология изучения мелатонинпродуцирующих клеток желудка и двенадцатиперстной кишки в моделях преждевременного старения

Модель ускоренного (радиационного) старения. Исследование проведено на 40 самцах белых крыс линии Вистар массой 180-200 г. Все животные были разделены на 4 группы: 1 и 1а – интактные крысы; 2 и 2а – облученные крысы. Гамма-облучение выполнено на аппарате ЛУЧ-1 (источник ^{60}Co ; мощность дозы $17,166 \times 10^4$ Гр/с). Животные получали ежедневную дозу 1,25 Гр в течение 5 дней. Животных 1 и 2-й групп выводили из опыта на 14-е сутки от начала облучения, а 1а и 2а групп – на 21-е сутки от начала облучения.

Модель преждевременного старения (пинеалэктомия). Исследование проведено на 40 самцах крыс линии Вистар в возрасте 3 мес., имеющих массу тела 130-140 г. Все животные были разделены на 2 группы по 20 особей. 1-я группа (контроль) была представлена интактными животными. У животных 2-й группы была произведена операция по удалению пинеальной железы – пинеалэктомия (ПЭ). Забой животных проводили на 30-е сутки после пинеалэктомии. Для изучения брали кусочки из зон наибольшего скопления энтерохромаффинных (ЕС) клеток – из пилорического и фундального отделов желудка.

Нокаутная линия мышей. Изучение МТ-иммунореактивных ЕС-клеток и взаимосвязи их поведения с пролиферацией и апоптозом эпителиоцитов при моделировании старения было выполнено на 48 эутимических мышцах линии BALB/c-пу, полученных из Итальянского национального центра по изучению старения – INRCA, Анкона.

Были исследованы три группы животных различного возраста: 4, 21 и 34 мес. Буквы *nu* в названии линии животных указывают на наличие рецессивной мутации, введенной инбредным мышам линии BALB/c, путем их скрещивания с атимическими «обнаженными» (*nu/nu*) мышами. Термином BALB/c-пу была названа популяция, полученная из гетерозиготных и гомозиготных эутимических мышей.

Объектом исследования служили образцы слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки.

Исследована также динамика аккумуляции ^3H -МТ у старых мышей-самцов в органах желудочно-кишечного тракта, в сердце, в плазме крови, эндокринных железах, моче и фекалиях.

Методология изучения экстрапинеального накопления мелатонина при различных заболеваниях в пожилом и старческом возрасте

Исследования проведены на биоптатах слизистой оболочки желудка, полученных при диагностической биопсии из антрального отдела у 84 пациентов, а также на биоптатах слизистой оболочки толстой кишки, полученных при колоноскопии у 52 больных пожилого и старческого возраста

(60-89 лет), страдающих хроническим гастритом, язвенной болезнью желудка, хроническим колитом, болезнью Крона, раком толстой кишки.

Для исследования предстательной железы были использованы образцы, полученные при биопсии или операции от 48 больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в возрасте старше 50 лет и от 32 больных раком предстательной железы (рак ПЖ) в возрасте старше 50 лет. В контрольной группе исследовался аутопсийный материал (предстательная железа), полученный от 22 мужчин в возрасте 25-69 лет, погибших от разных причин и не имевших патологии простаты.

Исследована также динамика аккумуляции ^3H -МТ у старых мышей-самцов в органах желудочно-кишечного тракта, сердце, плазме крови, эндокринных железах, моче и фекалиях.

Методология изучения содержания мелатонинсодержащих клеток в неэндокринных злокачественных опухолях у пациентов пожилого и старческого возраста

Для изучения количества и площади мелатонинсодержащих клеток в неэндокринных опухолях использовали биоптаты, полученные от 182 больных со злокачественными опухолями (мужчин – 101, женщин – 81): гортани (32), легких (23), желудка (44), толстой кишки (30), прямой кишки (53), диагностированных у пациентов пожилого и старческого возраста (60-89 лет). До проведения гистохимических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований во всех случаях производили патогистологическую верификацию опухолей согласно классификациям ВОЗ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологические и гистохимические методы. Материал фиксировали 10% нейтральным формалином ($\text{pH}=7,2$) и в жидкости Буэна. Парафиновые срезы (4-5 мкм) помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Гистологические и гистохимические исследования включали окраску гематоксилином-эозином, по Ван Гизону, толуидиновым синим, альциановым синим, аргирофильный метод Гримелиуса, аргентаффинный метод Массона.

Иммуногистохимические методы. Для изучения содержания МТ использовали кроличьи поликлональные специфические антитела к МТ, N-ацетилсеротонину и мексамину (все CIDtech. Res. Inc., титр 1:150) и серотонину (Dako, титр 1:200).

Пролиферативную активность клеток изучали с применением мышиных моноклональных антител к PCNA (клон PC10, Calbiochem, титр 1:50). Реакцию верифицировали АБП наборами для выявления кроличьих или мышиных иммуноглобулинов (Vectastain).

При иммунофлуоресцентной визуализации после инкубации с первыми антителами срезы промывали ФРК, наносили биотинилированные антитела к

иммуноглобулинам животного-донора первых антител или антитела, связанные с флуорохромом (изотиоцианат флуоресцеина или родамин G) и инкубировали соответственно протоколам коммерческих наборов (Dako).

Электронно-микроскопическое исследование проводили на материале, фиксированном в 2,5% глутаральдегиде с последующей дофиксацией 4% осмием. Материал заливали в смесь эпонов. Срезы (250-300 Å), полученные на ультратоме LKB-7A, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, после чего изучали в электронном микроскопе JEM-100B (Jeol).

Радиоавтография. МТ, меченный тритием, был получен в лаборатории радиоактивных препаратов Медицинского радиологического научного центра РАМН. Исследования проводили с использованием самцов мышей в возрасте 3 мес. (молодые животные) с массой тела 18 г и в возрасте 18 мес. (старые животные) с массой тела 22 г. Для исследования характера распределения ^3H -МТ по органам и тканям интактных животных МТ вводили из расчета 3,7 мБк/г массы животного. Животных декапитировали через 5, 15, 30 мин, 1, 3, 6 ч и 1 сут. После введения кровь и органы радиометрировали на сцинтилляционном счетчике. Также было изучено перераспределение антител к МТ (АтМ). Специфичность иммунологической активности АтМ проверяли иммунопероксидазным методом на препаратах эпифиза и тонкой кишки интактных животных по положительной реакции пинеалоцитов и ЕС-клеток, являющихся основным местом продукции МТ, с АтМ. ^{125}I -АтМ вводили в хвостовую вену в количестве 3,7 мБк/г массы животного. Животных декапитировали через 3, 6, 24 и 72 ч после введения ^{125}I -АтМ, отбирали кровь, выделяли органы и ткани для радиометрии. Для оценки накопления ^{125}I -АтМ в органах и тканях использовали тот же коэффициент дифференциального накопления (КДН), что и для МТ.

Морфометрия и компьютерный анализ микроскопических изображений. Морфометрические исследования выполнены с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений Nikon с применением прикладной компьютерной лицензионной программы анализа микроскопических изображений Videotest Morpho-4 согласно основным принципам стереологии и морфометрии.

Статистическая обработка результатов. Результаты исследований обрабатывали с помощью компьютерных программ EXCEL и STATISTICA 5.0 (Statsoft).

Автор выражает искреннюю признательность сотрудникам Медицинского радиологического научного центра РАМН к.б.н. Г.А. Петровой и к.м.н. В.В. Южакову за помощь и консультации при моделировании радиационного старения, проведении радиографических и электронно-микроскопических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная морфология пинеальной железы человека при старении

При изучении пинеальной железы человека была обнаружена относительная стабильность массы эпифиза до 75-80 лет; уменьшение массы железы отмечено нами только у лиц старше 80 лет. Это связано с тем, что атрофированная паренхима замещается гиперплазированной стромой (соединительной тканью), особенно на периферии и в прослойках между железистой тканью, что приводит к изменению архитектоники и увеличению долечатости железы.

При старении наблюдается полиморфизм и уменьшение размеров ядер пинеалоцитов. После 60 лет происходит изменение цитоархитектоники пинеальной железы в виде поляризации ядер пинеалоцитов, вследствие формирования розеток и клеточных фолликулов, которые обнаруживаются в 62% наблюдений у лиц старше 60 лет. Отмечается не только гиперплазия соединительной ткани, но и ее качественные изменения – в ней преобладают коллагеновые волокна, в то время как у людей молодого возраста – ретикулиновые.

При электронно-микроскопическом исследовании в паренхиме пинеальной железы обнаруживаются два типа пинеалоцитов (в зависимости от их формы, структуры ядра и органелл, плотности цитоплазматического матрикса и расположения клеток по отношению к соединительной ткани). Пинеалоциты I типа имеют округлую или неправильную форму; крупное ядро содержит в основном диффузный хроматин, отличается более светлой кариоплазмой, имеет неправильную форму за счет многочисленных инвагинаций ядерной мембраны. Ядрышко крупное, расположено чаще по центру ядра. Цитоплазматический матрикс сравнительно электронно-светлый, с небольшим количеством секреторных гранул. Митохондрий много, они имеют округлые или овальные профили, содержат неплотно упакованные, поперечно расположенные кристы.

Пинеалоциты II типа отличаются удлинённой формой, наличием цитоплазматических отростков, которые не формируют сплошного поля, а проникают между пинеалоцитами I типа. Клетки II типа располагаются часто между паренхимой и стромой железы, как бы обрамляя капилляры своими отростками. Ядра пинеалоцитов II типа электронно-плотные, содержат гетерохроматин, располагающийся у ядерной мембраны. Цитоплазматический матрикс сравнительно электронно-плотный, содержит многочисленные секреторные гранулы. В цитоплазме выражен шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР), митохондрии имеют сравнительно плотный матрикс и поперечно расположенные кристы.

Возрастные изменения в пинеалоцитах II типа проявляются изменением формы ядра, которое также становится фестончатым за счет инвагинаций ядерной мембраны. Увеличивается доля гетерохроматина в ядре, которое становится еще более плотным. В некоторых митохондриях просветляется цитоплазматический матрикс, в клетках встречаются единичные набухшие

органеллы. Характерно накопление зерен липофусцина и аутофагосом.

При старении прогрессивно снижается как общее количество пинеалоцитов, иммунопозитивных к МТ, так и их оптическая плотность, что свидетельствует об ослаблении продукции МТ в пинеальной железе.

Таким образом, при электронно-микроскопическом исследовании выявляются значительные изменения структуры пинеальной железы при старении, однако при этом сохраняется часть гормонально активной паренхимы и в пожилом возрасте, что обуславливает возможность сохранения функций пинеальной железы в стареющем организме.

Экстрапинеальные источники мелатонина при старении человека

Мелатонин-содержащие клетки желудка и кишечника

При иммуногистохимическом исследовании во всех отделах желудочно-кишечного тракта у человека была обнаружена положительная реакция энтерохромаффинных клеток с антителами к МТ и его предшественникам – серотонину, N-ацетилсеротонину и мексамину, что свидетельствует об активной продукции МТ в ЕС-клетках, а не о его пассивном накоплении.

Анализ результатов иммуногистохимических и морфометрических исследований накопления МТ в слизистой оболочке пилорического отдела желудка у людей мужского пола разных возрастных групп показал, что в то время как уровень секреции пинеального МТ прогрессивно снижается с возрастом, количество МТ-иммунопозитивных ЕС-клеток в слизистой оболочке желудка сохраняется практически стабильным до 60 лет (табл. 1).

Таблица 1

Накопление мелатонина в клетках слизистой оболочки желудка людей различного возраста

Возраст (лет)	Средняя площадь МТ-содержащих клеток (%)	Оптическая плотность (OpD, у.е.)
20 – 30	7,65±0,05	0,241±0,005
31 – 40	6,93±0,05	0,263±0,003
41 – 50	6,65±0,04	0,258±0,012
51 – 60	6,26±0,05	0,233±0,007
61 – 70	4,05±0,03*	0,245±0,010
71 – 80	3,11±0,02*	0,261±0,015
более 80	1,05±0,03*	0,254±0,004

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с показателем у людей в возрасте 20-30 лет.

По результатам морфометрического анализа установлено, что оптическая плотность МТ-иммунопозитивных ЕС-клеток не меняется с возрастом, но наблюдается уменьшение количества ЕС-клеток в слизистой оболочке желудка у людей старше 60 лет.

Мелатонин в нейроэндокринных клетках бронхиального эпителия

В эпителии бронхов у человека встречаются клетки, дающие положительную реакцию с антителами к серотонину, МТ, N-ацетилсеротонину и мексамину.

МТ-иммунопозитивные одиночные нейроэндокринные клетки диффузно рассеяны среди бронхиального эпителия. Форма клеток различная – треугольная, трапецевидная, грушевидная, веретенообразная, у некоторых клеток, так же, как и у ЕС-клеток в желудочно-кишечном тракте, на апикальном конце выявляется антенновидный отросток. Ультраструктура МТ-продуцирующих клеток бронхиального эпителия сходна с ЕС-клетками в кишечнике.

При старении популяция МТ-содержащих клеток бронхиального эпителия проявляет себя более устойчивой, чем в пинеальной железе и желудочно-кишечном тракте.

Достоверное снижение площади накопления и оптической плотности МТ-содержащих клеток в них отмечается только у лиц старше 70 лет (табл. 2).

Таблица 2

Накопление мелатонина в бронхиальном эпителии людей различного возраста

Возраст (лет)	Средняя площадь МТ- содержащих клеток (%)	Оптическая плотность (OpD, y.e.)
20 – 30	4,42±0,02	0,222±0,006
31 – 40	4,26±0,02	0,220±0,004
41 – 50	4,39±0,01	0,226±0,012
51 – 60	3,86±0,02	0,219±0,007
61 – 70	3,62±0,03	0,208±0,009
71 – 80	1,09±0,01*	0,195±0,011*
более 80	0,95±0,01*	0,157±0,003*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с показателем у людей в возрасте 20-30 лет.

Мелатонин-иммунопозитивные клетки поджелудочной железы

В эпителии выводных протоков и ацинусов поджелудочной железы человека нами обнаружены клетки, дающие положительную реакцию с антителами к МТ и его предшественникам. Морфометрическое исследование показало достоверное изменение показателей только в двух сводных возрастных группах (20-50 лет и старше 50 лет).

Мелатонин-иммунореактивные клетки коркового и мозгового слоев надпочечников

Под капсулой, а также на границе надпочечников человека верифицируются клетки, дающие положительную реакцию со специфическими антителами к серотонину, МТ, мексамину и N-ацетилсеротонину. Компьютерный анализ микроскопических изображений не показал достоверных изменений морфометрических показателей в зависимости от возраста.

Мелатонин-иммунореактивные клетки предстательной железы

В большинстве нейроэндокринных клеток предстательной железы во всех изученных возрастных группах было отмечено выраженное накопление МТ и серотонина. Площадь МТ-содержащих клеток достоверно снижалась с увеличением возраста. Так, у людей в возрасте 20-30 лет их площадь в среднем составила $5,33 \pm 0,03\%$, что в 4 раза больше, чем у людей старше 80 лет. Между возрастом пациентов и значениями площади МТ-содержащих клеток выявлена положительная корреляция. В то же время, не отмечалось достоверных изменений площади накопления серотонина в зависимости от возраста людей.

Оптическая плотность МТ и серотонина достигает максимального значения у лиц в возрасте 20-30 лет, у пациентов пожилого возраста наблюдается достоверное снижение этого показателя. Полученные данные свидетельствуют о снижении содержания серотонина и МТ в нейроэндокринных клетках предстательной железы человека с увеличением возраста ($p < 0,05$).

Мелатонин-иммунопозитивные клетки плаценты

При иммуногистохимическом исследовании плацент у рожениц разных возрастных групп накопление МТ была выявлена во всех структурных элементах ворсинчатого хориона – синцитиотрофобласте (СТБ), синцитиокапиллярных мембранах, синцитиальных почках и узлах, единичных клетках стромы и эндотелии сосудов.

Площадь МТ-содержащих клеток в плацентах рожениц 1, 3, 4 и 5-й групп была достоверно меньше, чем в плаценте рожениц 2-й группы (группы сравнения) ($p < 0,05$). Так, у юных рожениц (<18 лет) их площадь составила $0,39 \pm 0,01\%$, что в 17,7 раза меньше, чем в группе 2.

В плаценте женщин 29-35-летнего возраста (3-я группа) площадь накопления МТ была почти в 2 раза меньше ($3,78 \pm 0,04\%$), чем у женщин нормального репродуктивного возраста ($6,89 \pm 0,02\%$). С увеличением возраста площадь МТ-содержащих клеток в плаценте уменьшается.

Между возрастом роженицы и значениями площади МТ-содержащих клеток выявлена положительная корреляция. Оптическая плотность МТ достигает максимального значения у женщин 2-й группы ($0,34 \pm 0,01$ у.е.), а у женщин старше 36 лет (4 и 5-я группы) наблюдается достоверное снижение этого показателя ($p < 0,05$).

Мелатонин в естественных киллерах (НК-клетках)

При окрашивании НК-клеток азур-эозином в них выявлялись азурофильные гранулы, которые вступали в положительную реакцию с нитратом серебра по методу Гримелиуса. При электронно-микроскопическом исследовании изучаемые клетки представляли собой лимфоциты с круглым или почкообразным ядром, глыбчатым хроматином. Клетки имели относительно большую цитоплазму, крупные митохондрии, изолированные профили ШЭР.

Кроме того, выявлялись определенные, характерные для данных клеток, но не для лимфоцитов вообще, многочисленные везикулы, разбросанные по всей цитоплазме или сконцентрированные в углублении ядра, хорошо развитый пластинчатый комплекс и, наконец, плотные осmioфильные гранулы, которые являются своеобразным маркером НК-клеток.

Таким образом, впервые были получены данные, свидетельствующие о присутствии в секреторных гранулах естественных киллеров высокоактивных гормональных веществ – МТ и серотонина.

При старении отмечалась дегрануляция многих НК-клеток, при этом площадь и оптическая плотность МТ-иммунопозитивных НК-клеток снижались почти в 2 раза.

Мелатонин в эндотелиальных клетках

Проведенные исследования показали присутствие полиморфных осmioфильных гранул различной величины в эндотелии капилляров печени, селезенки и костного мозга. Размеры, форма и строение гранул были различными, однако наиболее часто встречались гранулы трех типов:

- **I тип** – гомогенные электронно-плотные гранулы овальной или бобовидной формы с очень узким светлым ободком вокруг электронно-плотной сердцевинки или без него;

- **II тип** – «перстневидные» гранулы характерного вида: электронно-плотная сердцевина расположена центрально или смещена к одному из полюсов с широким светлым ореолом вокруг нее;

- **III тип** – крупные гранулы округлой формы с электронно-плотной сердцевинкой и тонким светлым ореолом вокруг нее.

В некоторых эндотелиальных клетках гранулы располагались в непосредственной близости от цитоплазматической мембраны, обращенной в просвет сосуда. Встречались участки набухшего эндотелия, которые образовывали почковидные выпячивания, в их верхушках располагались одна или несколько секреторных гранул. Обнаруженные гранулы овальной или бобовидной формы характерны для МТ и его основного предшественника – серотонина. «Перстневидные» гранулы по своему строению идентичны секреторным гранулам В-клеток поджелудочной железы, ответственных за продукцию инсулина. Крупные округлые гранулы третьего типа подобны

катехоламинсодержащим гранулам клеток мозгового вещества надпочечников.

Проведенные электронно-микроскопические исследования позволили впервые установить, что местом локализации эндокринных секреторных гранул являются эндотелиальные клетки капилляров печени, селезенки и костного мозга. Идентификация секреторных гранул свидетельствует о том, что кроме присутствия в нейронах и пептидергических нервных волокнах, обнаруженных в сосудистой стенке, продукция гормонов возможна непосредственно в отдельных эндотелиальных клетках. Преобладающим типом гранул в эндотелиальных клетках являются секреторные нейроэндокринные гранулы, характерные для МТ. При старении количество секреторных гранул в эндотелиальных клетках резко уменьшается, во многих эндотелиоцитах отмечается картина экзоцитоза.

Радиоавтография органной кинетики мелатонина и антител к нему в организме старых мышей и крыс

Мыши. Результаты исследования динамики аккумуляции ^3H -МТ у старых мышей-самцов показывают, что уже через 5 мин после введения меченого МТ самые высокие концентрации его зарегистрированы в органах желудочно-кишечного тракта, сердце, плазме крови. При этом в органах желудочно-кишечного тракта наблюдалась максимальная аккумуляция ^3H -МТ: в слизистой оболочке желудка – через 30 мин после введения меченого гормона; в двенадцатиперстной кишке – через 5 мин, продолжала увеличиваться к 15 мин и оставалась высокой к 30 мин; в тонкой кишке – самое высокое содержание ^3H -МТ по сравнению со всеми остальными исследуемыми органами было через 30 мин, незначительно снижаясь к 6 ч; в толстой кишке – через 30 мин, снижаясь к 1 ч, возрастала к 3 ч и через 1 сут. По абсолютной величине коэффициент дифференциального накопления (КДН) снижался, но оставался более высоким, чем в других органах. В сердце мышей высокое содержание МТ наблюдалось 30 мин, в плазме крови максимум содержания меченого гормона регистрировался к 30 мин.

Крысы. У старых животных наблюдался динамический спад поглощения ^{125}I -АтМ тканью печени. Картина изменения уровня КДН у молодых и старых животных показала, что в почках у старых животных обмен не нарушен. Самый высокий КДН был зарегистрирован в легких, как молодых, так и старых крыс через 6 ч после введения меченой фракции АтМ, при этом у старых животных усиленная аккумуляция ^{125}I -АтМ наблюдалась уже к 3 ч.

В тимусе динамика накопления АтМ у молодых и старых животных была различна: к 3 ч КДН у старых животных был в 4 раза выше, чем у молодых, и постепенно увеличивался в течение суток. У молодых животных аккумуляция ^{125}I -АтМ происходила более интенсивно и через сутки была значительно выше, чем у старых крыс. Через 3 сут. АтМ не были обнаружены в тимусе обеих групп животных. В течение суток в сердце во все сроки (3, 6 и 24 ч) КДН у старых крыс был выше по сравнению с молодыми особями.

В гипофизе ^{125}I -АтМ не были выявлены во все сроки исследования.

Высокие уровни КДН ^{125}I -АтМ были обнаружены в желудочно-кишечном тракте у животных обеих групп: в пищеводе, слепой и двенадцатиперстной кишке – к 1 сут.; в пилорическом отделе желудка – к 3 ч; в тонкой кишке – к 6 ч после введения ^{125}I -АтМ. В желудочно-кишечном тракте самый высокий КДН был зарегистрирован через 3 ч в слизистой оболочке пилорического отдела желудка, более низкий – в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки. К 24 ч и далее КДН почти не изменялся в течение суток в тонкой кишке как старых, так и молодых крыс.

В плазме крови уровень ^{125}I -АтМ снижался, и к 3 сут. обнаружено более чем 6-кратное снижение его у старых и 5-кратное снижение у молодых крыс.

Таким образом, впервые получены данные о динамике распределения антител к МТ после его введения молодым и старым животным. Они показали неодинаковую степень поглощения и утилизации МТ различными органами как у молодых, так и, тем более, у старых животных.

Мелатонин-продуцирующие гастроинтестинальные клетки в моделях преждевременного старения Радиационная модель старения

Эпителий слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта находится в состоянии постоянного обновления, основу которого составляет пролиферация стволовых и дифференцирующихся клеток генеративной зоны. Количество МТ-иммунопозитивных клеток в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки крыс при радиационном старении обусловлено высоким индексом пролиферативной активности PCNA (44,8%) и митотическим индексом (2,9%), которые отражают высокий уровень физиологической регенерации эпителия двенадцатиперстной кишки животных 1-й (контрольной) группы (табл. 3).

Таблица 3

Морфометрические показатели клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки крыс при радиационном старении

Группа животных и условия эксперимента	I_{PCNA} (%)	I_{MIT} (%)	P_{CER} (%)	$N_{EC}/\text{мм}^2$	OP_{EC} (усл. ед.)	$N_{TK}/\text{мм}^2$
1-я (контроль)	44,8±0,2	2,9±0,1	0,64±0,02	162±4	0,205±0,002	169±23
2-я (гамма-облучение)	46,5±0,7*	4,2±0,4*	0,43±0,08*	130±12*	0,209±0,005	18±2*

Примечания: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. СЕР – серотонин-иммунопозитивные клетки; ЕС – энтерохромаффинные клетки; ТК – тучные клетки.

Иммуногистохимические исследования показали, что в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки позитивную реакцию на МТ дают энтерохромаффинные клетки, локализующиеся в эпителиальном слое крипт и

ворсинок, а также часть тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки.

При радиационном старении пролиферативный показатель по PCNA в криптах кишки возрастает до 46,5%, а митотический индекс – до 4,2%. Эти данные свидетельствуют о том, что восстановление эпителиального слоя слизистой оболочки у выживших животных протекает очень быстро, а пул стволовых клеток кишечного эпителия в этот период находится на стадии регенерации. Гистологическое изучение препаратов также указывает на то, что архитектура эпителиальной выстилки начинает нормализоваться. Однако численная плотность ЕС-клеток еще не достигает ее уровня у контрольных животных. Содержание тучных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки снижается почти в 10 раз.

Через 3 ч и 1 сут. после облучения животных сублетальной дозой 5 Гр отмечается тенденция к снижению общего содержания МТ-иммунопозитивных клеток в пилорическом отделе желудка. На 3-и сут. их количество достигает минимального уровня и достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$). В последующие сроки число МТ-продуцирующих клеток увеличивается и через 4 мес. лишь на 7% отличается от контрольных показателей (различие статистически недостоверно).

Количественные изменения ЕС-клеток в двенадцатиперстной кишке имеют следующие особенности. При воздействии дозой 5 Гр максимальное снижение числа клеток обнаруживается также на 3-и сутки после облучения. К 7 и 21-м суткам их количество увеличивается, но даже в отдаленные сроки (через 4 мес.) не достигает уровня, характерного для контрольных животных. Через 21 сут. и 4 мес. после облучения сублетальной дозой в эндокринных клетках визуализируется умеренная вакуолизация эндоплазматического ретикулаума, единичные миелоидные структуры и липофусциновые гранулы.

Пинеалэктомия как модель старения

У животных контрольной группы при окраске гематоксилином-эозином поверхность слизистой оболочки желудка в пилорическом и фундальном отделах образует ямки, которые выстланы цилиндрическим эпителием и имеют однородный вид, отличаясь глубиной в различных отделах. Железы, располагающиеся в различных отделах, также имеют особенности. В пилорическом отделе – желудочные ямки значительно глубже, а железы, связанные с ними, более короткие, чем в фундальном отделе.

Помимо эпителиоцитов в исследуемых отделах желудка при окраске по методу Гримелиуса обнаруживаются эндокринные клетки (апудоциты). Они имеют неправильную форму и располагаются в нижних отделах пилорических и фундальных желез. Обращает внимание явное преобладание апудоцитов в фундальном отделе по сравнению с пилорическим.

Морфометрический анализ показал, что общее число апудоцитов на 1 мм^2 слизистой оболочки фундального отдела желудка более чем на 20%

превышает их содержание в пилорическом отделе (148 ± 15 и 120 ± 12 клеток в 1 мм^2 соответственно). При иммуногистохимическом исследовании установлено, что МТ-продуцирующие клетки, составляющие основную массу апудоцитов, локализуются преимущественно в пилорическом отделе желудка, где их количество составляет 262 ± 23 на 1 мм^2 .

При моделировании старения (через один месяц после пинеалэктомии) при светооптическом исследовании изменений гистологического рисунка пилорического и фундального отделов желудка на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, не обнаруживается. В то же время, количественный анализ позволил выявить значительные изменения в количестве апудоцитов слизистой оболочки желудка по сравнению с интактными крысами.

Так, плотность распределения эндокринных клеток в 1 мм^2 слизистой оболочки в пилорическом и фундальном отделах возрастает более чем на 50%, достоверно отличаясь от контроля. Аналогичные изменения обнаружены и при морфометрии МТ-иммунопозитивных клеток в желудке, где после пинеалэктомии данный показатель возрастает до 323 ± 25 клеток на 1 мм^2 в пилорическом отделе и до 410 ± 24 клеток на 1 мм^2 в фундальном отделе. Поскольку пинеалэктомия – наиболее адекватная модель нормального процесса старения, такую динамику следует признать близкой к природной.

Нокаутная долгоживущая линия мышей

Желудок. Общее количество нейроэндокринных клеток возрастает с увеличением продолжительности жизни животных (604 ± 42 в 4, 705 ± 53 в 21 и 753 ± 53 в 34 мес. жизни). Подобная тенденция наблюдается и со стороны ЕС-клеток: количество серотонин/МТ-содержащих ЕС-клеток составляло 325 ± 52 в 4, 345 ± 49 в 21 и 389 ± 46 в 34 мес.

Двенадцатиперстная кишка. Общее количество нейроэндокринных клеток здесь (как и в желудке) возрастает с увеличением продолжительности жизни животных (196 ± 14 в 4, 311 ± 14 в 21 и 303 ± 11 в 34 мес.), хотя к 34-му месяцу отмечается тенденция к снижению количества ЕС-клеток по сравнению с 21 месяцем жизни. Со стороны ЕС-клеток отмечается выраженная гиперплазия с увеличением возраста: 186 ± 7 в 4, 372 ± 21 в 21 и 431 ± 22 в 34 мес. При этом пролиферативная активность эпителиоцитов с возрастом практически не изменяется (PCNA индекс составлял $15,7 \pm 0,7\%$ в 4, $15,7 \pm 0,8\%$ в 21 и $17,6 \pm 1,1\%$ в 34 мес.). Напротив, индекс апоптоза с возрастом увеличился (от $0,48 \pm 0,02\%$ в 4 до $0,85 \pm 0,03\%$ в 34 мес.).

Таким образом, проведенные исследования показали неодинаковую реакцию гастроинтестинальных МТ-продуцирующих клеток в различных моделях старения. При радиационном старении отмечалась выраженная гипоплазия МТ-иммунореактивных клеток в двенадцатиперстной кишке и особенно остро реагировала популяция тучных клеток, численность которых в опытной группе снижалась по сравнению с контрольной почти в 10 раз. В то же время при пинеалэктомии и в нокаутной долгоживущей линии мышей

популяция ЕС-клеток достоверно возрастала. Такое разночтение результатов, по-видимому, объясняется менее физиологичным (более жестким) действием радиации на пул стволовых клеток желудочно-кишечного тракта, чем влияние пинеалэктомии, которая более мягко (приближенно к реальности) моделирует процессы старения.

Экстрапинеальный мелатонин при различных заболеваниях у людей в пожилом и старческом возрасте

Мелатонин-содержащие клетки слизистой оболочки при патологии желудочно-кишечного тракта у людей в пожилом и старческом возрасте

Гастрит и язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки.

С целью выяснения участия МТ-содержащих ЕС-клеток слизистой оболочки желудка в процессе старения проведено изучение функциональной морфологии слизистых оболочек желудка и двенадцатиперстной кишки у пожилых и старых людей в норме, при язвенной болезни и гастрите.

Контрольная группа. ЕС-клетки обычно имеют веретеновидную, неправильную или треугольную форму с длинным апикальным отростком, обеспечивающим контакт ЕС-клеток с их микроокружением. ЕС-клетки, кроме аргирофильных свойств, присущих всем другим апудоцитам, обладают также аргентаффинными свойствами. При иммуногистохимическом исследовании большинство из них вступают в положительные реакции с антителами к серотонину и МТ, однако часть клеток обнаруживает иммунопозитивные свойства только к какому-либо одному гормону – серотонину или МТ. Среднее количество ЕС-клеток на 1 мм² слизистой оболочки в норме составляет 200,5±17,1 (для серотонин-содержащих) и 130,6±14,0 (для МТ-содержащих).

При электронно-микроскопическом исследовании ЕС-клетки имеют крупное овальное ядро с хорошо выраженным хроматином и ядрышком. В их цитоплазме обнаруживаются хорошо развитый ШЭР и гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР), митохондрии, рибосомы, пластинчатый комплекс с признаками различной функциональной активности, лизосомы, вакуоли.

Основным отличительным признаком ЕС-клеток служит присутствие в их цитоплазме многочисленных нейроэндокринных секреторных гранул, которые являются местом окончательного образования и хранения МТ, серотонина и пептидных гормонов (мотилина, вещества Р). При электронно-микроскопическом исследовании в цитоплазме ЕС-клеток выявляются полиморфные, округлые, гантелеобразные и ракетообразные гранулы с сердцевинной различной электронной плотности.

Хронический гастрит. У больных хроническим гастритом отмечается утолщение слизистой оболочки. В эпителии обнаруживаются дистрофические изменения различной степени выраженности. Границы между эпителиоцитами

не всегда четко контурируются. Собственный слой слизистой оболочки отечен, инфильтрирован лимфоцитами и плазматическими клетками. Изменение количества ЕС-клеток обнаруживало тенденции к гиперплазии, содержание их на 1 мм^2 слизистой оболочки было следующим: серотонин-содержащие – $250,6 \pm 17,1$ и МТ-содержащие – $190,6 \pm 14,5$.

У больных с атрофическим гастритом отмечается истончение слизистой оболочки. Желудочные ямки удлинняются, а железы укорачиваются. Кровеносные капилляры расширены, наблюдается стаз крови, иногда мелкие кровоизлияния. Выражена полиморфноклеточная инфильтрация с преобладанием лимфоцитов и плазматических клеток.

При анализе количества ЕС-клеток установлено, что их количество имеет тенденцию к увеличению и составляет $280,6 \pm 19,4$ (серотонин-содержащие) и $200,2 \pm 11,2$ (МТ-содержащие). Гранулы в них в основном концентрируются вблизи клеточной мембраны. В некоторых секреторных гранулах снижается электронная плотность.

Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки. Функциональная морфология и количество ЕС-клеток желудка в период ремиссии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки практически не отличались от контроля или от их состояния при гастрите (если таковой имелся, а в преобладающем большинстве случаев он имел место). Существенные отличия были обнаружены у больных в период обострения заболевания, что дает основание считать значимыми выявление и анализ их как прогностических маркеров течения патологического процесса.

Язвенная болезнь желудка (обострение). У больных язвенной болезнью желудка в период обострения по краю язвы выявляются зоны фибриноидного некроза. Выражена клеточная инфильтрация с преобладанием нейтрофилов и эозинофилов. Со стороны ЕС-клеток отмечалась гиперплазия – $380,6 \pm 13,4$ (серотонин-содержащие) и $290,2 \pm 12,7$ (МТ-содержащие).

Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (обострение). При обострении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки общее число аргирофильных клеток в антральном отделе желудка еще более увеличивается. При этом отмечается выраженная гиперплазия ЕС-клеток: $440,5 \pm 14,2$ (серотонин-содержащие) и $350,3 \pm 13,7$ (МТ-содержащие).

Количество ЕС-клеток при патологии желудка и двенадцатиперстной кишки в пожилом и старческом возрасте представлено в табл. 4.

Таблица 4

Количество ЕС-клеток в слизистой оболочке при патологии желудка у людей в пожилом и старческом возрасте (на 1 мм^2)

Группа больных	ЕС-клетки (серотонин)	ЕС-клетки (МТ)
----------------	--------------------------	-------------------

Группа больных	ЕС-клетки (серотонин)	ЕС-клетки (MT)
Контроль	200,5±17,1	130,6±14,0
Поверхностный гастрит	250,6±15,2 *	190,6±14,5 *
Атрофический гастрит	280,6±19,4*	200,2±11,2*
Язвенная болезнь желудка (обострение)	380,6±13,4*	290,2±12,7*
Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (обострение)	440,5±14,2*	350,3±13,7*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями.

При электронно-микроскопическом исследовании со стороны ЕС-клеток при язвенной болезни, как желудка, так и двенадцатиперстной кишки, отмечалось их различное функциональное состояние. Часть клеток была перенасыщена гранулами, в других клетках цитоплазма была опустошенной с резко выраженными профилями эндоплазматического ретикулума. Часть гранул сохраняла высокую электронную плотность, другая часть ее теряла. Нередко отмечался эндоцитоз гранул через клеточную мембрану.

Хронический колит и рак толстой кишки

Для объективной и унифицированной оценки роли и участия ЕС-клеток в патогенезе хронических колитов и рака толстой кишки проведено изучение их функциональной морфологии и количества в слизистой оболочке сигмовидного отдела толстой кишки, так как именно в нем располагается наибольшее количество эндокринных клеток.

Контрольная группа. Однослойный цилиндрический эпителий слизистой оболочки интактной сигмовидной кишки состоит из каемчатых или бескаемчатых призматических энтероцитов, бокаловидных клеток и отдельных эндокринных клеток (апудоцитов). Каемчатые призматические (всасывательные) энтероциты – наиболее многочисленные клетки кишечного эпителия (составляют около 90% общего числа клеток кишечного эпителия в сигмовидной кишке). Характерной чертой их дифференцировки является образование щеточной каемки из плотно расположенных микроворсинок на апикальной поверхности клеток. Среди каемчатых энтероцитов располагаются бокаловидные клетки, в цитоплазме которых обнаруживается большое количество муцинов – основных компонентов кишечной слизи. Клетки Панета в норме в сигмовидной кишке практически не встречаются.

В слизистой оболочке сигмовидного отдела толстой кишки присутствуют ЕС-клетки, содержащие серотонин и MT. Среднее количество ЕС-клеток на 1 мм² слизистой оболочки в норме составляет 20,7±5,0 для серотонин-содержащих клеток и 30,0±2,3 для MT-содержащих.

Хронический колит (ХК). При ХК наблюдались воспалительные неспецифические изменения различной степени выраженности без образования язвенных дефектов. Патологический процесс носил характер поверхностного или диффузного воспаления. При поверхностном воспалении наблюдался отек слизистой оболочки, увеличение диаметра капилляров, укорочение и расширение крипт, незначительное увеличение количества бокаловидных клеток с повышенным содержанием в них слизи, незначительная очаговая инфильтрация кишечной стенки лимфоцитами, гранулярными лейкоцитами, плазматическими клетками.

Сосуды микроциркуляторного русла были расширены и полнокровны. Среди тучных клеток многие были дегранулированными. При диффузном воспалении слизистой оболочки наблюдалось распространение лимфоплазмоцитарной инфильтрации на всю слизистую оболочку, отмечались уплотнение, дистрофия, некроз и слущивание покровного эпителия.

Со стороны ЕС-клеток отмечалось как увеличение аргентаффинных ЕС-клеток, окрашенных по Массону, так и ЕС-клеток, выявленных при иммуноцитохимических реакциях, соответственно, на серотонин и МТ. Среднее их количество составило для серотонин-иммунопозитивных клеток $80,2 \pm 6,1$ и для МТ-иммунопозитивных клеток $100,1 \pm 8,4$ на 1 мм^2 слизистой оболочки. При этом также отмечалось увеличение числа секреторных гранул в их цитоплазме с одновременной активизацией рельефа эндоплазматического ретикулула.

Неспецифический язвенный колит (НЯК). НЯК характеризуется геморрагически-гнойным воспалительным процессом различной степени выраженности. В сравнительно «мягких» вариантах отмечается утолщение слизистой оболочки с многочисленными геморрагиями, эрозиями и мелкими изъязвлениями, в то время как при тяжелых процессах наблюдалась гипоплазия слизистой оболочки, вплоть почти до полной ее аплазии. В эпителии обнаруживаются дистрофические изменения различной степени выраженности, часто встречаются язвы, размеры и глубина которых зависят от распространенности некробиотического процесса.

Границы между эпителиоцитами не всегда четко контурируются. Отмечается отек собственной пластинки слизистой оболочки, которая обильно инфильтрирована лимфоцитами, эозинофильными лейкоцитами и плазматическими клетками. Наблюдается гиперплазия бокаловидных клеток с гиперсекрецией слизи, которая на электронно-микроскопическом уровне выражается в большом количестве слизистых вакуолей в цитоплазме бокаловидных клеток.

Часто участки регенерации сочетались с участками фиброза, деформировавшего структуру стенки кишки. При этом отмечалось развитие грубоволокнистой соединительной ткани и образование грануляций в дне язв. В некоторых случаях при изменениях слизистой оболочки, аналогичным вышеописанным, в участках компенсаторной гиперплазии и аденоматоза

слизистой оболочки отмечался атипизм клеток, гиперхромия ядер, разрывы базальной мембраны желез, что формировало разрастания железистого рака.

Во всех случаях НЯК в слизистой оболочке обнаруживались клетки Панета, причем нередко их число значительно превышало обычное количество этих клеток в типичных местах их расположения – криптах тощей и подвздошной кишок.

Количество ЕС-клеток практически не отличалось от такового при хроническом колите. Так, среднее количество серотонин-иммунопозитивных клеток составляло $80,7 \pm 7,3$, а МТ-иммунопозитивных – $100,8 \pm 9,5$ на 1 мм^2 слизистой оболочки, соответственно. При окраске по Массону также не обнаруживалось различий в количестве ЕС-клеток с таковым при хроническом колите, среднее количество их составляло $60,0 \pm 4,5$ на 1 мм^2 слизистой оболочки. При электронно-микроскопическом исследовании ЕС-клетки демонстрировали различную степень насыщения цитоплазмы секреторными гранулами.

Болезнь Крона (БК) представляет собой неспецифический воспалительный рецидивирующий процесс. Воспаление при БК носит гранулематозный характер. Признаки воспалительного процесса обнаруживались во всех слоях стенки кишки, но в отличие от НЯК, в слизистой оболочке они были менее выражены. Эпителиоциты были уплощены, иногда отмечались аплазированные участки слизистой оболочки (в зоне язв щелевидной формы, поверхность которых была покрыта фибрином). В воспалительном инфильтрате преобладали лимфоциты, скопления которых формировали гранулематозные саркоидоподобные образования, но без гигантских клеток Пирогова-Ланганса. Такие гранулемы выявлялись преимущественно в периваскулярной и периневральной соединительной ткани во всех слоях кишечной стенки.

При анализе количества ЕС-клеток установлено, что число аргентаффинных ЕС-клеток, окрашенных по методу Массона, хотя и увеличивается по сравнению с контролем ($70,4 \pm 6,0$ на 1 мм^2 слизистой оболочки), но достоверно не отличается от их количества при хроническом и неспецифическом язвенном колите. При этом отмечается переход секреторных гранул в ЕС-клетках из базальной части в длинный отросток – «антенну», который в ряде случаев достигает просвета крипты.

Рак толстой и прямой кишки (РТПК). Все исследуемые опухоли представляли собой РТПК. В подавляющем большинстве гистологически верифицировалась аденокарцинома различной степени дифференцировки. Для изучения количества эндокринных клеток при опухолевом процессе исследовали интактную слизистую оболочку сигмовидной кишки вне расположения опухоли.

Количество аргентаффинных ЕС-клеток, окрашенных по методу Массона, снижалось в 2 раза по сравнению с контролем ($10,8 \pm 1,2$ на 1 мм^2 слизистой оболочки). При использовании иммуноцитохимического метода и последующей морфометрии обнаружено, что среднее количество серотонин-

иммунопозитивных ЕС-клеток составляет $10,0 \pm 1,2$, а МТ-иммунопозитивных ЕС-клеток – $10,7 \pm 1,3$ на 1 мм^2 слизистой оболочки, то есть снижается по сравнению с контрольными показателями почти в 3 раза. При электронномикроскопическом исследовании обнаруживается большое количество ЕС-клеток с дегрануляцией и отмечается более частый выход отдельных гранул путем экзоцитоза в межклеточное пространство.

Количество ЕС-клеток в слизистой оболочке при патологии толстой кишки у людей в пожилом и старческом возрасте отражены в табл. 5.

Таблица 5

Количество ЕС-клеток в слизистой оболочке при патологии толстой кишки у людей пожилого и старческого возраста

Группа больных	Метод Массона	Серотонин	МТ
Контроль	$20,2 \pm 4,2$	$20,7 \pm 5,0$	$30,0 \pm 2,3$
Хр. колит	$60,3 \pm 4,2^*$	$80,2 \pm 6,1^*$	$100,1 \pm 8,4^*$
Несп. язв. колит	$60,0 \pm 4,5^*$	$80,7 \pm 7,3^*$	$100,8 \pm 9,5^*$
Б-нь Крона	$70,4 \pm 6,0^*$	$10,7 \pm 1,7^*$	$110,9 \pm 1,4^*$
Рак толстой кишки	$10,8 \pm 1,2^*$	$10,0 \pm 1,2^*$	$10,7 \pm 1,3^*$

Примечание: количество клеток содержащихся в 1 мм^2 среза.

*- $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями.

Мелатонин-содержащие клетки предстательной железы при опухолях, ассоциированных с возрастным изменением функции простаты

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы

При микроскопическом исследовании предстательной железы большей частью узлы имеют аденоматозную структуру. Они построены из тесно расположенных ветвистых желез причудливой формы, образующих многочисленные крипты и сосочковые выросты. Железы выстланы 1-2 слоями клеток высокого призматического эпителия, в области сосочков количество слоев увеличивается.

Цитоплазма эпителиальных клеток светлая, слегка зернистая, в апикальных отделах выявляются жировые включения. Ядра гиперхромные, округлой формы располагаются преимущественно в базальных отделах клеток.

Самые большие узлы иногда достигали в диаметре 5-6 см, состояли из многочисленных кист довольно крупного размера, разделенных тонкими фиброзными, нередко гиалинизированными прослойками, иногда содержащими пучки гладких мышц. Перегородки между кистами нередко разрушаются и тогда образуются крупные гроздевидные кистозные

конгломераты, в просвет которых выступают остатки перегородок в виде фиброзных выступов с булавовидным утолщением на конце.

Кисты выстланы одноярядным высоким цилиндрическим, кубическим или плоским эпителием, иногда обнаруживаются единичные сосочковые образования. В просвете кист гомогенное содержимое, окрашивающееся эозином в бледно-розовый цвет. Иногда наблюдается множество мелких амилоидных телец.

Значительно реже встречаются «фиброзно-аденоматозные» узлы, построенные из немногочисленных редко разбросанных трубочек, выстланных кубическим или низкопризматическим эпителием с хорошо очерченными границами, слабо заметной цитоплазмой и довольно крупным ядром. В просвете железистых трубочек находится секрет ярко-розового цвета.

При иммуногистохимическом исследовании в ткани ДГПЖ обнаруживалось довольно большое количество нейроэндокринных клеток, накапливающих МТ и его основной предшественник – серотонин.

Площадь МТ-содержащих клеток в ДГПЖ ниже, чем в контрольной группе у больных того же возраста и составляет $4,34 \pm 0,01\%$ у 50-59-летних пациентов, что в 2 раза больше, чем у пациентов 60-69 лет, а для серотонина она была равна $4,36\%$ в группе 50-59 лет ($p < 0,05$). С увеличением возраста площадь серотонин-содержащих клеток увеличивается, особенно у пациентов с ДГПЖ в возрасте 70 лет и старше ($5,33 \pm 0,02\%$).

У пациентов 50-59 лет оптическая плотность МТ-содержащих клеток достигает максимального значения ($0,35 \pm 0,02$ у.е.), а серотонина ($0,38 \pm 0,01$ у.е.). С увеличением возраста пациентов наблюдается достоверное снижение оптической плотности МТ, а плотность серотонина увеличивается ($p < 0,05$). Площадь МТ- и серотонин-позитивных клеток при ДГПЖ была достоверно выше, чем у людей контрольной группы.

Рак предстательной железы

Все исследуемые случаи рака предстательной железы были гистологически представлены аденокарциномой, характеризующейся клеточным полиморфизмом и различной степенью дифференцировки опухолевых клеток. Площадь накопления МТ в раковых опухолях достоверно снижалась с увеличением возраста ($p < 0,05$). Для серотонина отмечается тенденция к значительному увеличению показателей ($2,33 \pm 0,02\%$). У пациентов величина площади МТ-содержащих клеток составила $3,34 \pm 0,01\%$, в группе 60-69 лет она была равна $3,28 \pm 0,02\%$, а для серотонина – $2,02 \pm 0,01\%$.

Оптическая плотность МТ-позитивных клеток достигает максимального значения у больных 50-59 лет ($0,35 \pm 0,01$ у.е.), обратная тенденция наблюдается при анализе плотности серотонин-позитивных клеток ($0,43 \pm 0,02$ у.е.).

Во всех аденокарциномах были обнаружены серотонин- и МТ-содержащие нейроэндокринные клетки. При окраске гематоксилином-эозином

они были крупнее обычных клеток, цитоплазма их была эозинофильна, ядро смещено в апикальный полюс.

Обширные и множественные скопления нейроэндокринных клеток в основном обнаруживались в высокодифференцированных опухолях. При этом опухолевые нейроэндокринные клетки не демонстрировали признаков пролиферативной активности.

При иммуногистохимическом исследовании раковых опухолей предстательной железы с использованием специфических антисывороток к МТ было обнаружено, что в 20 из 32 случаев аденокарциномы часть клеток, в которых была зарегистрирована положительная реакция с антисывороткой к серотонину, вступала в положительную реакцию с антисыворотками к МТ.

Проведенные иммуногистохимические исследования показали, что в раковых опухолях предстательной железы содержатся нейроэндокринные клетки, ответственные за продукцию серотонина и МТ.

Таблица 6

Содержание мелатонина и серотонина в клетках предстательной железы у людей в норме, при доброкачественной гиперплазии и аденокарциноме

Группа мужчин	В пределах нормы				Повышено			
	мелатонин		серотонин		мелатонин		серотонин	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Интактная предстательная железа (n=22)	20	90,9	21	95,5	2	9,1	1	4,5
ДГГДЖ (n=48)	42	87,5	45	93,7	6	12,5	3	6,3
Аденокарцинома (n=32)	13	40,6	11	34,3	19	59,4	21	65,7

Из данных, представленных в табл. 6, следует, что в интактной предстательной железе накопление МТ было в пределах нормы чаще, чем в ткани аденокарциномы. При этом не наблюдались различия в накоплении МТ в аденокарциноме и в интактной железе в 33% образцов, а в 59% образцов накопление МТ в аденокарциноме была выше, чем в интактной железе.

Данные показывают, что у примерно 60% лиц, страдающих аденокарциномой предстательной железы, содержание МТ и серотонина в клетках железы повышено, что может быть использовано для диагностики названного заболевания.

Мелатонин-содержащие клетки в неэндокринных злокачественных опухолях у пациентов пожилого и старческого возраста

Мелатонин-содержащие клетки в опухолях гортани

При окраске гематоксилином-эозином опухоли гортани во всех случаях имели строение плоскоклеточного рака. Из 32 исследованных новообразований 13 опухолей представляли собой плоскоклеточный неороговевающий рак, 19 – плоскоклеточный ороговевающий рак. В 9 из 32 исследованных опухолей были обнаружены апудоциты: в 4 плоскоклеточных ороговевающих раках и в 5 плоскоклеточных неороговевающих раках.

Обработка препаратов по Гримелиусу показала, что во всех 9 случаях апудоциты в ткани опухоли давали положительную аргирофильную реакцию, в то время как при окраске опухолей по методу Массона только в 3 случаях их 9 выявлялись клетки, окрашивающиеся в коричневый цвет. И аргирофильные, и аргентаффиновые клетки располагались, как правило, группами по 3-5 клеток.

В некоторых наблюдениях встречался рассыпной тип расположения: по одной клетке в различных участках опухоли, преимущественно вокруг крупного сосуда. Среднее количество аргирофильных клеток составляло $30,41 \pm 0,04$ на 1 мм^2 .

При окрашивании по методу Севки в 4 опухолях из 9 были обнаружены клетки, окрашивающиеся в оранжевый цвет. Локализация, форма и размеры этих и аргентаффиновых клеток в ряде наблюдений совпадали.

Следует отметить, что общее количество этих клеток было значительно больше, чем клеток, вступающих в положительную иммуногистохимическую реакцию с антителами против серотонина и МТ.

При обработке препаратов антителами к серотонину, N-ацетилсеротонину, 5-метокситриптамину (мексамину) и МТ были зарегистрированы следующие результаты: в 3 наблюдениях аргентаффиновые клетки вступали в положительную иммуногистохимическую реакцию с антисывороткой к серотонину; клетки, дающие положительную реакцию с антисывороткой к МТ, были выявлены в 2 наблюдениях, они также вступали в положительную реакцию с антисыворотками против N-ацетилсеротонина или мексамина.

При сопоставлении гистологического типа и гистохимического профиля опухолей было отмечено, что все 3 опухоли, в которых были обнаружены аргентаффиновые клетки, представляли собой плоскоклеточный ороговевающий рак.

Мелатонин-содержащие клетки в опухолях легких

Светооптическое исследование препаратов опухолей легких, окрашенных гематоксилином-эозином, показало, что все 23 исследуемые опухоли относились к раковым новообразованиям и распределялись следующим образом: 11 – плоскоклеточные раки без ороговеания, 8 –

плоскоклеточные раки с ороговением, 4 – аденокарциномы.

Плоскоклеточные раки были построены из комплексов эпителиальных клеток, содержащих округлое или полиморфное ядро, в котором часто наблюдались атипичные фигуры митозов. В центре комплексов встречались роговые массы, иногда формирующие концентрические слоистые образования – так называемые «раковые жемчужины».

Аденокарциномы имели характерное для данного типа опухолей строение. В плоскоклеточных неороговевающих раках довольно часто обнаруживались опухолевые клетки в лимфатических щелях, что свидетельствовало о возможности более быстрого метастазирования этого типа опухолей по сравнению с плоскоклеточными раками с ороговением.

В 9 из 23 исследованных новообразований были обнаружены апудоциты. Положительная аргирофильная реакция была зарегистрирована во всех 9 наблюдениях, в то время как аргентаффинная только в 5 из 9 случаев. Среднее количество аргирофильных клеток в раковых опухолях легких составляло $40,32 \pm 0,36$ на 1 мм^2 .

При окраске по методу Севки в 2 аденокарциномах и в 1 плоскоклеточном раке с ороговением встречались клетки, окрашивающиеся в оранжевый цвет. В плоскоклеточных раках без ороговения этих клеток не отмечалось.

Для идентификации типа продуцируемых веществ был использован иммуногистохимический метод, в результате чего в 7 из 9 раковых опухолей, содержащих апудоциты, были обнаружены клетки, в которых присутствовал серотонин. В то время как МТ был идентифицирован только в более дифференцированных опухолях – 2 аденокарциномах и 1 плоскоклеточном раке с ороговением.

Таким образом, было установлено, что в ткани аденокарциномы легкого есть апудоциты, содержащие серотонин и МТ. В плоскоклеточном раке с ороговением встречаются также серотонин- и МТ-содержащие клетки, в то время как в плоскоклеточной раковой опухоли без ороговения они отсутствуют. Следует обратить внимание, что клетки, иммунореактивные к серотонину и МТ, дают также положительную реакцию с антисыворотками против предшественников этих веществ – мексамина и N-ацетилсеротонина, что свидетельствует о продукции серотонина и МТ в апудоцитах, присутствующих в составе неэндокринных злокачественных опухолей.

Мелатонин-содержащие клетки в опухолях желудка

При гистологическом исследовании 44 раковых опухолей желудка, из которых 23 составляли аденокарциномы, 9 – скирр и 12 – солидные раки; апудоциты встречались в 12 опухолях. Все они давали положительную аргирофильную реакцию. Среднее количество этих клеток составляло $51,7 \pm 0,24$ на 1 мм^2 . Опухоли имели гистологическое строение, типичное для каждой вышеуказанной формы.

В аденокарциномах иногда встречались очаги ослизнения, в некоторых

участках довольно массивные. В скirrosных опухолях в той или иной степени были выражены соединительнотканые прослойки, в солидных раках встречались тяжи, построенные из опухолевых клеток с многочисленными митозами.

В 9 из 13 опухолей желудка, содержащих эндокринные клетки, были обнаружены серотонинпродуцирующие апудоциты; они встречались в аденокарциномах (6 наблюдений), солидных раках (2 наблюдения), скirrosном раке (1 наблюдение). При окраске гематоксилином-эозином они были крупнее обычных клеток, располагались в базальной части атипичных желез или инфильтрировали подлежащие ткани. Цитоплазма их эозинофильна, ядро смещено в апикальный полюс. При окраске по методу Масона во всех 9 случаях эти клетки вступали в положительную реакцию, окрашиваясь в различные оттенки коричневого цвета.

При использовании антител к серотонину в 9 наблюдениях эндокринные клетки вступали с ними в положительную реакцию, причем количество иммунореактивных клеток было больше в высокодифференцированных опухолях (аденокарциномах). В менее дифференцированном раке (скirros, 1 наблюдение) встречались единичные серотонин-продуцирующие клетки, которые располагались, в основном, вблизи сосудов.

При иммуногистохимическом исследовании раковых опухолей желудка с использованием антител к МТ, N-ацетилсеротонину и мексамину было обнаружено, что в 4 наблюдениях (3 аденокарциномы и 1 солидный рак) часть клеток, в которых была зарегистрирована положительная реакция с антителами к серотонину, вступала в положительную реакцию с антителами против МТ и N-ацетилсеротонина.

Мелатонин-содержащие клетки в опухолях толстой и прямой кишки

Из 30 изученных опухолей толстой кишки 17 располагались в поперечно-ободочной кишке, 6 – в восходящем отделе и 7 – в нисходящем отделе толстой кишки. При гистологическом исследовании 24 опухоли представляли собой аденокарциномы, 6 – солидные раки. Из 24 аденокарцином 19 опухолей были высокодифференцированными и содержали железы различных величин и форм. В некоторых клетках встречались атипичные фигуры митозов. Гистологическая картина солидного рака была обычной для этого вида опухолей. Из 30 случаев в 10 (в 9 аденокарциномах и 1 солидном раке) были обнаружены опухолевые эндокринные клетки. Среднее количество аргирофильных клеток составило $4,23 \pm 0,61$ на 1 мм^2 .

При иммуногистохимическом исследовании аденокарцином толстой кишки в 5 наблюдениях были обнаружены серотонин-продуцирующие клетки. Во всех 6 опухолях, содержащих вышеописанные иммунореактивные клетки, были обнаружены аргирофильные клетки, количество и локализация которых совпадали с числом и расположением клеток, вступающих в положительные реакции с антителами к серотонину и МТ.

Из 53 изученных раковых опухолей прямой кишки 41 составляли

аденокарциномы и 12 – солидный рак. 34 аденокарциномы были построены из желез, выстланных базофильными, не содержащими слизи клетками, расположенными в один или несколько слоев, либо, наоборот, слизееобразующим эпителием. В 7 наблюдениях обнаружился низкодифференцированный железистый (слизистый или коллоидный) рак. В этих опухолях железы редки, в основном клетки располагаются поодиночке или группами в слизистых массах, расслаивающих строму, а иногда формирующих неправильной формы полости. Встречаются также солидно-крибровые структуры и тяжи, в которых железистый просвет выявляется нечасто. В 12 случаях наблюдались солидные раки, клетки которых формировали тесно прилегающие друг к другу тяжи, разделенные тонкими прослойками соединительной ткани. В 19 из 53 изученных злокачественных новообразований были обнаружены апудоциты, дающие положительную аргирофильную реакцию. Они встретились в 13 аденокарциномах и в 6 солидных раках. Среднее количество аргирофильных клеток составляло $5,46 \pm 0,18$ на 1 мм^2 . В 16 наблюдениях были идентифицированы аргентаффинные клетки (в 12 аденокарциномах и 4 солидных раках).

В 8 наблюдениях аденокарцином из 13 при окраске по методу Севки были обнаружены клетки, окрашивающиеся в оранжевый цвет, характерный для серотонина. Они в подавляющем большинстве наблюдений локализуются в тех же зонах, что и аргентаффинные клетки. Положительный результат обеих реакций дал основание предположить, что эти клетки, содержащие серотонин, могут быть ответственны за выработку индолилалкиламинов. Для выяснения этого вопроса было предпринято иммуногистохимическое исследование с применением антител к серотонину, МТ и их аналогам. При этом было верифицировано присутствие серотонина в 13 наблюдениях аденокарциномы, в 9 случаях описанные клетки, кроме серотонина, содержали также МТ.

Иммуногистохимическое исследование солидных раков показало, что эти аргентаффинные клетки только в 1 случае вступали в реакцию с антителами к серотонину, в то время как с другими антителами реакции были отрицательны. В 2 из 4 наблюдений, в которых были обнаружены аргентаффинные клетки, они окрашивались по методу Севки в оранжевый цвет, что подтверждало наличие в них серотонина.

Ультроструктурная верификация гормональной функции неэндокринных опухолей у пациентов пожилого и старческого возраста

Электронно-микроскопическому исследованию было подвергнуто 12 опухолей (по 1-2 наблюдению каждой локализации), в которых гистохимическими и иммуногистохимическими методами было обнаружено наибольшее количество эндокринных клеток. Это обстоятельство позволяло рассчитывать на более высокую степень вероятности обнаружения секреторных гранул в апудоцитах при прицельной заточке блока.

В ткани плоскоклеточного неороговевающего рака гортани среди

опухолевых эпителиальных клеток, содержащих большое количество беспорядочно располагающихся тонофибрилл и кератогиалина, встречались клетки, богатые митохондриями, рибосомами с хорошо развитым пластинчатым комплексом и элементами ШЭР и ГЭР. В этих клетках обнаруживались полиморфные секреторные гранулы различной величины, некоторые гомогенные, некоторые же с электронноплотной сердцевиной и узким светлым ореолом вокруг нее.

В ткани плоскоклеточного ороговевающего рака легкого среди опухолевых эпителиальных клеток были обнаружены клетки с округлыми или неправильной формы ядрами, в цитоплазме которых, кроме различных органелл, идентифицировались секреторные гранулы различной формы и размеров (округлые, вытянутые, гантелеобразные) с осмиофильной электронноплотной сердцевиной и узким светлым ореолом вокруг нее или гомогенноплотные.

В ткани аденокарциномы легкого, состоящей из различных опухолевых клеток с электронно-микроскопическими признаками пневмоцитов II порядка, недифференцированных клеток, клеток типа слизистых, встречались эндокринные клетки с множеством разнообразных секреторных гранул, выраженными профилями ШЭР, ГЭР, большим количеством митондрий и рибосом.

В ткани аденокарцином желудка при электронно-микроскопическом исследовании обнаруживались как недифференцированные опухолевые клетки, так и раковые клетки с признаками дифференцировки, среди которых были выявлены клетки с эндокринной дифференцировкой, содержащие сравнительно большое количество секреторных гранул, часть из которых имела стертую сероватую облаковидную сердцевину, а часть – эксцентрично расположенную электронно-плотную сердцевину.

В ткани аденокарцином толстой и прямой кишки среди опухолевых клеток различной степени дифференцировки встречались эндокринные клетки с полиморфными секреторными гранулами различной электронной плотности. Наряду с ними, цитоплазма этих клеток была богата митохондриями, рибосомами, лизосомами, элементами ШЭР. Проведенное электронно-микроскопическое исследование позволило обнаружить в эндокринных клетках, встречающихся в эпителиальных злокачественных опухолях различной локализации, основной ультраструктурный признак эндокринной дифференцировки – секреторные гранулы. Наличие этих гранул свидетельствует о возможности продукции, а не о накоплении гормонально активных веществ в опухоли.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить характер изменения количества МТ-содержащих клеток и степень их плотности в процессе старения.

МТ – один из гормонов APUD-системы, в течение многих лет рассматривался только как гормон пинеальной железы. Как только стало

доступным использованием высокочувствительных антител к индолилалкиламинам, оказалось возможным идентифицировать МТ не только в пинеальной железе, но также и в экстрапинеальных тканях – сетчатке, Гардериановой железе, мозжечке, слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, в печени, почках, надпочечниках, тимусе, щитовидной железе, поджелудочной железе, яичниках, каротидном теле, плаценте, эндометрии, а также и в неэндокринных клетках, таких как тучные клетки, естественные киллеры, эозинофильные лейкоциты, тромбоциты и клетки эндотелия. Функционально МТ-позитивные клетки являются неотъемлемой частью APUD-серии и звеном диффузной нейроэндокринной системы как универсальной системы адаптации, контроля и защиты организма. Принимая во внимание большое количество МТ-позитивных апудоцитов во многих органах, широкий спектр биологической активности МТ и особенно его геропротекторные свойства, о чем свидетельствуют данные диссертационного исследования, представляется возможным рассматривать экстрапинеальный МТ в качестве сигнальной молекулы для локальной координации клеточных функций в норме, при различной патологии и старении организма.

ВЫВОДЫ

1. При старении происходит замещение атрофированной паренхимы пинеальной железы соединительной тканью, отмечается относительная стабильность массы железы у людей в возрасте до 75-80 лет и уменьшение ее после 80 лет. Прогрессивно снижается общее количество пинеалоцитов, иммунопозитивных к мелатонину, и их оптическая плотность, но сохраняется часть гормонально активной паренхимы данного органа.

2. При возрастном прогрессирующем снижении количества мелатонина в пинеалоцитах, количество мелатонин-иммунопозитивных ЕС-клеток в слизистой оболочке желудка сохраняется стабильным до 60 лет и снижается у людей в возрасте 61-85 лет, но оптическая плотность мелатонин-иммунопозитивных энтерохромаффинных клеток остается при этом стабильной, что свидетельствует о снижении содержания мелатонина в общем пуле клеток слизистой оболочки желудка у людей старше 60 лет за счет численного уменьшения популяции энтерохромаффинных клеток, а не за счет снижения его содержания в самих энтерохромаффинных клетках.

3. Снижение количества мелатонин-содержащих клеток и мелатонина в них в бронхиальном эпителии происходит у лиц старше 70 лет. Площадь мелатонин-содержащих клеток ацинусов и протоков поджелудочной железы в возрасте 50 лет снижается вдвое. В надпочечниках изменения количества мелатонин-иммунопозитивных клеток с возрастом не выявлено.

4. В ткани предстательной железы обнаружено большое количество мелатонин-иммунопозитивных клеток, площадь и оптическая плотность которых снижаются с увеличением возраста, что ассоциируется с развитием в данном органе гиперпластических процессов, характерных для старения.

5. При иммуногистохимическом исследовании плацент родильниц разного возраста мелатонин-содержащие клетки выявлены во всех структурных элементах ворсинчатого хориона: синцитиотрофобласте, синцитиокапиллярных мембранах, синцитиальных почках и узлах, единичных клетках стромы и эндотелии сосудов. Содержание мелатонина в этих клетках снижается с увеличением возраста родильниц (начиная с 28 лет).

6. В иммунокомпетентных клетках (тучных клетках и естественных киллерах) зарегистрировано высокое содержание мелатонина, количество которого при старении снижается.

7. При радиационном моделировании старения наблюдается выраженная гипоплазия мелатонин-иммунореактивных клеток в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, примерно в 10 раз снижается количество тучных клеток. При пинеалэктомии и у нокаутных долгоживущих мышей количество мелатонин-иммунопозитивных энтерохромаффинных клеток возрастает.

8. В слизистой оболочке желудка больных хроническим гастритом обнаружено увеличение количества мелатонин-содержащих энтерохромаффинных клеток. При обострении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки отмечена выраженная гиперплазия мелатонин-содержащих клеток слизистой оболочки и активизация их цитоплазматических органелл.

9. В слизистой оболочке толстой кишки при неопухолевых заболеваниях (хронические колиты, болезнь Крона) у людей обнаружена гиперплазия мелатониниммунореактивных клеток, тогда как при раке их количество резко снижается.

10. При аденокарциноме предстательной железы обширные и множественные скопления мелатонин-содержащих клеток обнаружены в высокодифференцированных опухолях. При доброкачественной гиперплазии эти клетки располагаются в виде небольших незрелых гиперпластических узелков. Снижение содержания мелатонина в клетках предстательной железы сочетается с развитием в ней гиперпластических процессов, ассоциированных со старением.

11. В злокачественных эпителиальных (раковых) опухолях гортани, легких, желудка и толстой кишки обнаружены апудоциты, содержащие мелатонин. Количество мелатонин-содержащих клеток в прогрессирующих опухолях снижается, достигая минимальных значений при распространенных метастазах, что имеет важное прогностическое значение.

12. Комплекс проведенных исследований демонстрирует ассоциацию изменений количества экстрапинеальных мелатонин-содержащих клеток и уровня содержания в них мелатонина с интенсивностью прогрессии опухолей и хронических воспалительных заболеваний у людей пожилого и старческого возраста, что позволяет сформулировать концепцию, согласно которой: динамика развития морфо-функциональных изменений экстрапинеальных мелатонин-содержащих клеток отражает степень интенсивности процесса

старения и развития заболеваний, ассоциированных с возрастом, и является важным звеном патогенеза соматических заболеваний у пожилых и старых людей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Нарушение количества мелатонин-иммунопозитивных клеток и содержания в них мелатонина в предстательной железе следует рассматривать как признак интенсивного развития в ней гиперпластических процессов, ассоциированных со старением.

2. При выработке прогноза и выборе терапии, оптимизирующей нарушенные процессы нейроиммуноэндокринного взаимодействия при старении, рекомендуется определять в биоптатах количество мелатонин-содержащих клеток.

3. В слизистой оболочке толстой кишки гиперплазию мелатонин-иммунореактивных клеток следует рассматривать как признак развития неопухолевых заболеваний (хронические колиты, болезнь Крона), тогда как резкое снижение этого показателя указывает на наличие злокачественных опухолей.

4. Снижение количества мелатонина в неэндокринной злокачественной опухоли является признаком ее прогрессии, а минимальные значения этого параметра могут рассматриваться как маркер наличия распространенных метастазов.

5. Обнаружение выраженных геропротекторных свойств мелатонина позволяет рекомендовать разработку лекарственных препаратов на его основе для профилактики и лечения нарушений нейроиммуноэндокринной регуляции функций у людей пожилого и старческого возраста.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах по перечню ВАК Минобрнауки РФ

1. Аничков Н.М. Хронический простатит: 1) этиология, патогенез, моделирование, классификации /Н.М. Аничков, И.В. Князькин // Успехи геронтологии.- 2003. – Вып. 11. - С. 84–92.

2. Биogerонтологические аспекты исследования нейроэндокринных клеток в культуре ткани / Н.И. Чалисова, В.О. Полякова, И.В. Князькин, С.С. Коновалов, И.М. Кветной // Успехи геронтологии. – 2005. – Вып. 17. – С. 42–49.

3. Значение мелатонина в диагностике некоторых заболеваний внутренних органов и перспективы его применения в практической медицине / К.И. Прошаев, А.Н. Ильницкий, Т.В. Кветная, И.В. Князькин, Е.С. Голубицкая, А.В. Антропов, О.Е. Антропова // Мед. акад. ж. – 2007. – Т. 7, № 2. – С. 95–105.

4. Князькин И.В. Мелатонин, старение и опухоли предстательной

железы / И.В. Князькин // Успехи геронтологии. – 2008. – Вып. 21. – С. 74-79.

5. Князькин И.В. Пинеальная железа и экстрапинеальные источники мелатонина в висцеральных органах при естественном старении человека / И.В. Князькин // Успехи геронтологии. – 2008. – Вып. 21. – С. 83-85.

6. Князькин И.В. Хронический простатит: 2) клиническое течение, диагностика, современные методы лечения / И.В. Князькин, Н.М. Аничков // Успехи геронтологии. – 2003. – Вып. 11. – С. 93–103.

7. Князькин И.В. Экстрапинеальный мелатонин в процессах ускоренного и преждевременного старения у крыс / И.В. Князькин // Успехи геронтологии. – 2008. – Вып. 21. – С. 80-82.

8. Эффекты действия мелатонина на старение клеток тимуса и периферические Т-лимфоциты *in vitro* / В.О. Полякова, И.В. Князькин, С.С. Коновалов, И.М. Кветной, А.В. Трофимов, Е.Н. Чернышова, А.Ю. Чебракова // Успехи геронтологии. – 2005. – Вып. 17.-С.10–14.

Монографии

9. Кветная Т.В. Мелатонин: роль и значение в возрастной патологии / Т.В. Кветная, И.В. Князькин. – СПб.: ВМедА, 2004. – 111 с.

10. Князькин И.В. Апоптоз в онкоурологии / И.В. Князькин, В.Н. Цыган. // СПб.: Наука, 2007. – 240 с.

11. Нейроэндокринные клетки желудочно-кишечного тракта в моделях преждевременного старения / А.В. Трофимов, И.В. Князькин, И.М. Кветной. – СПб.: ДЕАН, 2005. – 208 с.

12. Нейроиммуноэндокринология мужской половой системы, плаценты и эндометрия / И.В. Князькин, И.М. Кветной, П.Н. Зезюлин, С.В. Филиппов. – СПб.: Изд-во общества «Знание» С.-Петербурга и Лен. области, 2007. – 192 с.

13. Роль нейроиммуноэндокринных механизмов в онкогеронтологии предстательной железы и мочевого пузыря / В.Х. Хейфец, И.М. Кветной, И.В. Князькин, А.В. Трофимов, А.Т. Супиев – СПб.: Изд-во «Система», 2004 – 92 с.

Статьи и главы

14. Геропротекторное и регуляторное влияние мелатонина на тимоциты в исследованиях *in vitro* / В.О. Полякова, И.В. Князькин, А.В. Трофимов, И.М. Кветной // Геронтология и гериатрия. – М., 2005. – Вып. 4. – С. 230–232.

15. Карцинома простаты: молекулярные нейроэндокринные механизмы, ассоциированные с возрастом / А.Т. Супиев, И.В. Князькин, С.С. Коновалов, И.М. Кветной // Геронтология и гериатрия. – М., 2005. – Вып. 4. – С. 117–119.

16. Молекулярная физиология нейроиммуноэндокринных взаимодействий / М.А. Пальцев, И.М. Кветной, В.О. Полякова, И.В. Князькин, И.Э. Ингель, В.В. Южаков // Руководство по нейроиммуноэндокринологии. – М.: Медицина, 2006. – С. 131–149.

17. Нейроиммуноэндокринология предстательной железы и яичек / М.А. Пальцев, И.М. Кветной, И.В. Князькин, В.Х. Хейфец, А.Т. Супиев, П.Н.

Зезюлин, С.В. Филиппов // Рук-во по нейроиммуноэндокринологии. – М.: Медицина, 2006. – С. 286–299.

18. Некоторые особенности нейроэндокринных механизмов старения у мужчин/ А.Т. Супиев, И.В. Князькин, С.С. Коновалов, И.М. Кветной // Геронтология и гериатрия. – М., 2004. – Вып. 3. – С. 113–116.

Тезисы докладов

19. Геропротекторное действие мелатонина на клетки тимуса / В.О. Полякова, И.М. Кветной, И.В. Князькин, А.В. Трофимов // Проблемы старения и долголетия: IV Нац. конгр. геронтологов и гериатров Украины. – 2005. – Т. 14. – С. 46–47.

20. Геропротекторное действие мелатонина на клетки тимуса / В.О. Полякова, И.В. Князькин, П.Н. Зезюлин, Ю.А. Тафеев // Общество, государство и медицина для пожилых: Тез докл. III Всерос. науч.-практ. конф. – М., 2006. – С. 75–76.

21. Зезюлин П.Н. Состояние предстательной железы и профилактика простатопатий у лиц, занимающихся атлетизмом / П.Н. Зезюлин, И.В. Князькин, А.Т. Марьянович // Под ред. В.А. Таймазова // III Международный конгресс «Человек, спорт, здоровье»: Мат-лы конгресса. – СПб. – 2007. – С. 68–69.

22. Князькин И.В. Мелатонин: регуляторное действие на клетки тимуса / И.В. Князькин, В.О. Полякова // Человек и лекарство: Мат-лы XII Рос. нац. конгр. – М., 2005. – С.514.

23. Мелатонин и старение человека / Т.В. Кветная, И.В. Князькин, А.В. Антропов, Е.С. Голубицкая, О.Е. Антропова, С.С. Коновалов // Перспективы фундаментальной геронтологии: Мат-лы конф. – СПб., 2006. – С. 51–52.

24. Мелатонин – нейроэндокринный маркер возрастной патологии / Т.В. Кветная, И.В. Князькин, С.С. Коновалов, Е.С. Голубицкая, А.В. Антропов // Человек и лекарство: Мат-лы XII Рос. нац. конгр. – М., 2005. – С. 406.

25. Мелатонин – молекулярный маркер возрастной патологии / Т.В. Кветная, И.В. Князькин, Е.С. Голубицкая // Молекулярная медицина и безопасность: II Междунар. конф., Москва, 20-21 окт. 2005 г. – М., 2005. – С. 150.

26. Мелатонин в иммунокомпетентных клетках: продукция, депонирование, биологическая роль / И.М. Кветной, Т.В. Кветная, В.О. Полякова, А.В. Трофимов, И.В. Князькин, П.Н. Зезюлин, С.В. Филиппов // Человек и лекарство: Мат-лы XIII Рос. нац. конгр. – М., 2006. – С. 161.

27. Нейроиммуноэндокринология тимуса: экспрессия гормонов и пролиферативная активность / В.О. Полякова, И.М. Кветной, А.А. Ярилин, С.С. Коновалов, И.В. Князькин // Нейроиммунология. – 2003. – Т. 1, № 2. – С. 118–119.

28. Особенности экспрессии гормонов в иммунокомпетентных клетках при старении *in vitro* / В.О. Полякова, С.С. Коновалов, И.В. Князькин, П.Н.

Зезюлин, М.В. Терземан, Ю.А. Тафеев // Перспективы фундаментальной геронтологии: Мат-лы конф. – СПб., 2006. – С. 104–105.

29. Проблема рецидивирующего простатита. Причины и пути решения / И.В. Князькин, П.Н. Зезюлин, Г.И. Гурко, А.А. Сморгчов // Мат-лы I Съезда амбулаторных хирургов РФ // Стационарозамещающие технологии. Амбулаторная хирургия. – №4(16) – СПб., 2004. – С. 100.

30. Экстрапинеальный мелатонин: роль в нейроиммуно-эндокринной регуляции гомеостаза / И.М. Кветной, И.В. Князькин, Т.В. Кветная, В.О. Полякова, А.В. Трофимов // Человек и лекарство: Мат-лы XII Рос. нац. конгр. – М., 2005. – С. 406–407.

31. Chlamydia trachomatis DNA in malignant and hyperplastic prostate tissue / V. Smelov, E. Grigorovitch, I. Knyazkin, V. Startzev, A. Gorelov // 14th European Urological Winter Forum, Davos, Switzerland, 2005. – P. 278–279.

32. Detection of human papillomavirus, herpes simplex virus and cytomegalovirus in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer biopsy core specimens / V. Smelov, E. Grigorovitch, A. Gorelov, I. Knyazkin, V. Startzev // 14th European Urological Winter Forum, Davos, Switzerland, 2005. – P. 279–280.

33. Knyazkin I.V. How gut hormones affect the brain / I.V. Knyazkin, A.T. Maryanovich // Integrative Physiology and Behavior: Pavlov's Centenary Symp., Saint-Petersburg, Russia, June 19–22, 2004 / Pavlov Institute of Physiology. – SPb., 2004. – P. 29–30.

34. Neuroimmunoendocrine interactions and role of extrapineal melatonin in premature aging / V. Polyakova, A. Trofimov, I. Knyazkin, S. Konovalov // 6th Intern. Conf. Neuroimmunomodulation, Athens, Greece. – Athens, 2005. – P. 65–66.

35. Neuroimmunoendocrinology: key role of microscopy for creation of new discipline / I.M. Kvetnoy, T.V. Kvetnaia, V.O. Polyakova, A.V. Trofimov, I.V. Knyazkin, S.S. Konovalov. // 13th Europ. Congr. Microscopy, Antwerp, Belgium. – Antwerp, 2004. P. 1–2.

36. Neuroimmunoendocrinology: microscopical advances for new discipline / I. Kvetnoy, T. Kvetnaia, I. Knyazkin, S. Konovalov // 6th Multinat. Congr. Microscopy, Pula, Croatia, June 1–5, 2003. – Pula, 2003. – P. 126–127.

37. Radiation model of premature ageing: immunomodulating effect of dipeptid vilon / I. Kvetnoy, I. Knyazkin, P. Zezjulin, N. Filippov, A Trofimov. // 3rd Europ. Congr. Biogerontology, Florence, Italy, 2002. – Florence, 2002. – P. 67–68.

Список сокращений

APUD	аббревиатура английского словосочетания «Amine Precursor Uptake and Decarboxylation»
EC	энтерохромаффинные клетки
NK	естественные киллеры
PCNA	ядерный антиген пролиферирующих клеток
SP	вещество Р
АБП	авидин-биотин пероксидазный комплекс
АтМ	антитела к мелатонину
БК	болезнь Крона
ГЭР	гладкий эндоплазматический ретикулум
ДГПЖ	доброкачественная гиперплазия предстательной железы
КДН	коэффициент дифференциального накопления
МТ	мелатонин
НЯК	неспецифический язвенный колит
ПЖ	предстательная железа
ПЭ	пинеалэктомия
РТПК	рак толстой и прямой кишки
СТБ	синцитиотрофобласт
ФРК	физиологический раствор Кунса
ХК	хронический колит
ШЭР	шероватый эндоплазматический ретикулум

Князькин И.В. ЭКСТРАПИНЕАЛЬНЫЙ МЕЛАТОНИН В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ // Автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.53, – СПб., 2008. 40 с.

Подписано в печать «31» января 2008 г. Формат 60*84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 2,0

Тираж 150 экз. Заказ 28.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО "Принт – Экспресс"

197101, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А

10-